Aus der biologischen Abteilung (Prof. v. Dungern) des Institutes für experimentelle Krebsforschung (Geh. Rat Prof. Czerny, Exzellenz).

Ueber den Einfluss der OH- und H-Jonen auf die Komplementablenkung und das differente Verhalten verschieden hoch erhitzter Sera bei der Komplementfixierung.

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Hohen medizinischen Fakultät

der

Grossherzoglich Badischen
Ruprecht-Karls-Universität in Heidelberg

vorgelegt von

Srul-Meier Lindenschatt
aus Warschau

HEIDELBERG
Universitäts-Buchdruckerei von J. Hörning.
1913.

Gedruckt mit Genehmigung der medizinischen Fakultät
der Universität Heidelberg.

Dekan:
Geh. Hofrat Dr. W. Fleiner.

Referent:
Geh. Hofrat Dr. H. Kossel.

1913.

Meinen lieben Eltern
in Dankbarkeit
gewidmet.

Das durch v. Dungern im Jahre 1899[1]) als Ambozeptorablenkung gedeutete Phänomen der Komplementbindung wurde zuerst von Bordet und Gengou[2]) richtig erkannt. Es wird nämlich das Komplement stets dann fixiert, wenn eine eiweisshaltige Antigene bei Gegenwart aktiven Normalserums mit den spezifischen Antikörpern in Berührung kommen. Gengou[3]) gelang es, bei Kaninchen durch intravenöse Injektion von Hühnereiweiss, Kuhmilch, Hundeserum Antikörper zu erzeugen, die analog dem von Bordet gegen Choleravibrionen dargestellten Immunserum, mit dem entsprechenden Antigen Präzipitate bildeten. Die dabei auch eintretende Komplementbindung zeigten Bordet und Gengou dadurch, dass die nach einiger Zeit hinzugefügten roten Blutkörperchen mit dem entsprechenden hämolytischen Serum ungelöst bleiben, weil das für die Hämolyse erforderliche Komplement nicht mehr vorhanden ist.

Da das Zustandekommen der Präzipitierung und das der Komplementablenkung bei gleicher Versuchsanordnung zu beobachten ist, hatte man zuerst das Präzipitat als Ursache der Komplementfixierung angesehen. In diesem Sinne hat Moreschi[4])[5]) die Komplementablenkung gedeutet und sogar quantitativ das Verschwinden des Komplementes durch die Grösse des Präzipitates zu erklären versucht. Als es aber Neisser und Sachs gelungen war, zu zeigen[6]), dass die Komplementablenkung auch bei Anwendung so geringer Antigenmengen noch deutlich sichtbar ist, dass sie sichtbaren Präzipitate nicht mehr geben (nach Fried-

berger[7]) sogar bei 1:1000000000 Antigen), mehrten sich in kurzer Zeit die Beweise für die von Gengou zuerst aufgestellte Ambozeptortheorie der Komplementablenkung. Denn durch Vorbehandlung der Tiere mit Eiweiss treten im Blute nicht nur Präzipitine, sondern auch Ambozeptoren auf, die dann mit dem homologen Antigen das Komplement binden. Entsprechend dieser jetzt allgemein anerkannten Tatsache gelingt es auch, sowohl das Präzipitinserum, als auch das Antigen so zu modifizieren, dass sie sich nur entweder für die Komplementablenkung oder für die Präzipitinreaktion als brauchbar erweisen. So zeigte Friedberger[8]), dass die präzipitinhaltigen Sera nach Erhitzung auf 67°, nur noch die Komplementablenkung aufweisen; ebenso verhalten sich alte, nicht für die Präzipitinreaktion brauchbare Bakterienextrakte. Sie erzeugen nämlich, nach Wassermann und Bruck[9]), mit dem entsprechenden Immunserum zusammengebracht, Komplementablenkung.

Die vollkommene Unabhängigkeit der die Komplementablenkung und Präzipitation gebenden Antikörper wurde aber erst durch Muir und Martin[10]), später durch Moreschi[11]) bewiesen. Es gelang den genannten Forschern, durch Auswahl entsprechender Versuchstiere Immunsera zu bekommen, von denen die einen nur präzipitierten, andere aber nur für die Komplementablenkung brauchbar waren. Erstere Reaktion geben Vögel, die mit Kaninchenserum vorbehandelt werden, letztere wird erzeugt durch Immunisierung von Kaninchen mit Meerschweinchenserum.

Da es möglich ist, mittels der Komplementfixierung sowohl Antikörper als auch Antigene nachzuweisen und als solche zu identifizieren, so lag es nahe, diese Laboratoriumsversuche auch auf die Praxis anzuwenden, und wenn auch über die Ursache der Komplementablenkung die Gelehrten noch nicht einig sind, hat doch dieses Prinzip im Laufe der Zeit grosse praktische

Bedeutung gewonnen. Man hatte zuerst die durch die Einwirkung von Mikroorganismen im Blute kreisenden Antikörper, nachzuweisen gesucht und dazu Extrakte spezifischer, für die gegebene Krankheit charakteristisch veränderter Gewebe genommen. Wenn auch die so gewonnenen Extrakte mit dem zu untersuchenden Serum Komplementablenkung geben, so bleibt es noch fraglich, ob wirklich die Extrakte in solchen Fällen als Antigene wirken. Es ist noch nicht in einwandsfreier Weise gelungen, mittels solcher Antigene Antikörper zu erzeugen, mit denen man später spezifische Komplementbindungsreaktionen anstellen könnte. Es hat sich vielmehr herausgestellt, dass die Komplementablenkung auch dann zu beobachten ist, wenn man statt dieser „spezifischen Antigene" andere Extrakte, ja sogar anorganische Substanzen anwendet. Trotz aller theoretischen Einwände, die man gegen diese Komplementablenkungsreaktionen als Antikörperreaktionen machen könnte, ist ihre praktische Bedeutung in kurzer Zeit sehr gross geworden. Eine in richtiger Weise ausgeführte Komplementablenkungsreaktion ist streng spezifisch und liefert noch komplette Hemmung in den Fällen, wo keine sichtbare Präzipitate mehr wahrnehmbar sind.

Die Farbenunterschiede, die bei den Komplementbindungsreaktionen zustande kommen, beim Ausbleiben der Hämolyse ein Undurchsichtigwerden der Blutaufschwemmung, dagegen bei eingetretener Lösung ein Lackfarbenwerden, sind sehr leicht voneinander zu unterscheiden und bedeutend besser zu beurteilen, als die Präzipitate, die bei den grossen Verdünnungen nur angedeutet sind. Alle diese Vorteile haben auch die Bordet-Gengousche Reaktion praktisch anwendbar gemacht.

Zuerst haben Neisser und Sachs[12]) für die forensische Eiweissdifferenzierung eine Komplementablenkungsmethode ausgearbeitet, die, wenn auch in

der Praxis hinter dem Uhlenhuth-Wassermannschen Präzipitationsverfahren stehend, doch den ersten Schritt für die praktische Ausnutzung des Komplementbindungsphänomens gebildet hat. Später wurden Methoden angegeben sowohl für die Diagnose von Krankheiten mit bekannten als auch unbekannten, resp. nicht züchtbaren Erregern. Die wichtigste Anwendung hat die nach Wassermann benannte Reaktion gefunden, die für Diagnose der Syphilis bis jetzt von keiner andern übertroffen wurde.

Die Serodiagnostik der Lues mittels der Wassermannschen Reaktion zeigt eine formale Analogie mit dem Phänomen der Komplementbindung, wenn es auch unwahrscheinlich ist, dass es sich hier um analoge Prozesse handelt. In ähnlicher Weise werden auf serologischem Wege u. a. auch Lepra und Echinococcus diagnostiziert; in letzter Zeit hat Hammer[13]) eine brauchbare Methode für die Diagnose der Tuberkulose ausgearbeitet. Aber auch die malignen Tumoren können serologisch nachgewiesen werden; es gelang nämlich v. Dungern[14]), aus roten Blutkörperchen ein Extrakt darzustellen, das, als Antigen angewandt, mit Serum von Tumorkranken Komplementbindung aufweist. Ob alle diese Komplementablenkungsreaktionen, deren Zahl sich von Tag zu Tag steigert, in ihrem Wesen gleiche Prozesse darstellen, hat man auf verschiedenem Wege zu erforschen versucht. Schon die Natur der anwendbaren Antigene, die es nicht gestattet, Antikörper zu erzeugen, spricht gegen die vollkommene Analogie einerseits zwischen der spezifischen Komplementablenkung im Sinne Bordets und anderseits denjenigen Komplementfixierungsreaktionen, die die Sera mit verschiedenen Organextrakten aufweisen. Auch auf anderem Wege könnte man die Verschiedenheit oder Identität der verschiedenen Komplementbindungsreaktionen festzustellen suchen, und zwar aus dem Verhalten einzelner Teile des Komplementes bei der Ablenkung.

Ferrata[15]) hat nämlich gezeigt, dass es durch die Dialyse möglich ist, das Komplement in zwei Teile zu spalten, von denen der eine im Globulinniederschlag vorhanden ist und nach Brand[16]) „Mittelstück“ genannt wird, der andere aber in Lösung bleibt und „Endstück“ heisst. Brand hat auch gezeigt, dass die ambozeptorbeladenen Blutkörper zuerst nur das Mittelstück binden; erst dann tritt das Endstück an die Blutkörperchen heran. Das Verhalten der oben genannten Komponenten des Komplementes bei den verschiedenen Ablenkungsreaktionen hat keine Unterschiede erwiesen. Nach Henderson-Smith[17]) wird sowohl bei der Komplementablenkung mit bakteriellen Extrakten als auch mit Präzipitaten nur das Mittelstück gebunden, während das Endstück in Lösung bleibt; ein ähnliches Verhalten zeigt das Komplement bei der Wassermannschen Reaktion. Wenn wir somit aus dem Verhalten einzelner Teile des Komplementes bei seiner Bindung keinen Aufschluss über die Gleich- oder Verschiedenartigkeit der Bindungsreaktion bekommen können, so ist es möglich, dass chemisch differente Stoffe imstande sind, verschieden die Komplementablenkungsreaktion zu beeinflussen.

An dieser Stelle soll erstens der Einfluss der OH- und H-Jonen auf die spezifische Komplementablenkungsreaktion im Sinne von Bordet, sodann aber das Verhalten anderer Bindungsreaktionen bei derselben Versuchsanordnung untersucht werden.

Dass die Hydroxylionen einen Einfluss auf die Komplementablenkung besitzen, zeigten Sachs und Altmann[18]). Sie fanden, dass die positive Wassermannsche Reaktion durch Zusatz entsprechender Mengen von Natronlauge aufgehoben wird. Im Gegensatz dazu besitzt die Säure eine die Komplementablenkung luetischer Sera begünstigende Wirkung; den oben genannten Autoren ist es gelungen[19]), durch Säurezusatz, auch in den Fällen eine positive Wassermannsche Reaktion

zu bekommen, in denen ohne Säure eine Hämolyse eintritt. Diese Versuche wurden später durch Abramon[20]) bestätigt: er untersuchte auch die Wirkung der OH- und H-Jonen auf die spezifische Komplementablenkung und fand, dass das Antigen und Antiserum durch Natronlauge und Salzsäure so modifiziert werden, dass sie ihre spezifischen Eigenschaften verlieren. Der genannte Autor hat auch festgestellt, dass die OH-Jonen das Zustandekommen der Komplementfixierung hemmen; eine gleiche Wirkung der Salzsäure war wegen der direkten Beeinflussung des Antigens und Antiserums nicht sicher nachzuweisen.

Dass es sich bei der die Komplementablenkung luetischer Sera aufhebenden Wirkung der OH-Jonen und der die Bindung begünstigender Wirkung von H-Jonen nicht um eine Erscheinung handelt, die regelmässig bei allen Bindungsreaktionen zu beobachten ist, geht daraus hervor, dass bei der v. Dungernschen Tumorreaktion durch Alkali- resp. Säurezusatz eine Trennung der Lues von den Tumorseren möglich wurde.

Von Dungern fand[21]), dass die Tumorsera mit dem entsprechend dargestellten Acetonextrakt aus roten Blutkörperchen eine Komplementablenkung geben; in sehr vielen, wenn auch nicht allen Fällen zeigen die Sera von Syphiliskranken dieselbe Erscheinung, verhalten sich aber anders, wenn man NaOH und HCl zusetzt. Durch diesen Zusatz ist es möglich, eine Trennung der Tumorsera von denjenigen der Lueskranken durchzuführen. Die Carcinomsera weisen nämlich trotz Gegenwart von Alkali die Komplementablenkung auf, häufig sogar in noch stärkerem Grade als ohne Natronlauge, während die Luessera meist keine Bindung zeigen. Anders ist es aber, wenn man statt Alkali Säure hinzufügt: wir beobachten dann eine Hemmung der Luessera, dagegen eine Hämolyse bei Seren der Tumorkranken.

Um die Einwirkung der OH- und H-Jonen auf die spezifische Komplementablenkung zu untersuchen, wurden bei Kaninchen, durch 3—4 malige, zuerst intravenöse, dann intraperitoneale Injektion von Pferdeserum Antikörper gegen dasselbe erzeugt. 9—10 Tage nach der letzten Injektion wurde das Blut aus der Ohrvene entnommen und, nachdem sich das Serum abgeschieden hatte, durch Zentrifiguren von den Blutkörperchen befreit. Das so gewonnene Serum prüfte ich auf den Präzipitingehalt, indem zu einer konstanten Menge von Präzipitinserum, gewöhnlich $^1/_{10}$, absteigende Mengen Antigen hinzugefügt wurden. Es stellte sich bald heraus, dass nicht alle Tiere Präzipitine liefern; bei manchen gelang es sogar nach 5 maliger Injektion nicht, ein brauchbares Serum zu bekommen. Dagegen lieferte ein Tier (Nr. 415), das nach der 2. Injektion einen schweren anaphylaktischen Schock bekommen hatte, und nur durch 2 Stunden fortgesetzte Äthernarkose gerettet wurde, ein besonders starkes Antiserum, das noch mit 1 : 80000 Antiken deutliche Präzipitate gab.

Zur Komplementablenkung benutzte ich nur Präzipitinsera von gewisser Stärke, und zwar solche, die wenigstens mit 1 : 5000—1 : 10000 Pferdeserum deutliche Trübung zeigten. Die Eigenhemmung der am 2. Tag nach der Entnahme geprüften Sera war verschieden gross, doch nicht in regelmässiger Abhängigkeit von dem Präzipitingehalte. Da die Blutentnahme stets 9—10 Tage nach der letzten Injektion gemacht wurde, ist es unwahrscheinlich, dass das noch im Blute kreisende und nicht abgebaute Antigen an der Eigenhemmung Schuld gehabt hätte.

Das inaktivierte Präzipitinserum wurde für die Komplementablenkung benutzt. Eine regelmässige Beziehung zwischen der Stärke der Komplementablenkung und dem Präzipitingehalte des Serums war nicht immer festzustellen; im allgemeinen aber zeigten diejenigen

Sera stärkere Komplementablenkung, die auch stärker präzipitierten.

Wie die nachstehende Tabelle zeigt, hat sich bei fast allen Versuchen die Präzipitinreaktion weniger empfindlich als die Komplementablenkungsreaktion erwiesen.

Tabelle 1.

Art der Reaktion	Absteigende Mengen von Antigen (Pferdeserum) Antiserum 1/20.														
	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280	1/2560	1/5120	1/10240	1/20480	1/40960	1/81920	1/16384
Komplementbindungsreak.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	–
	+			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
Präzipitinreaktion.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	–	–	–
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				

Als grösste Dose des Antiserums bei den Komplementablenkungsversuchen wurde die Hälfte der ersten nicht hemmenden Dose genommen, es wurden aber auch mit viel geringeren Mengen des Antiserums Komplementablenkungsversuche gemacht. Trotz absteigender Mengen des Antigens blieb die Komplementablenkung bis zu einem gewissen Minimum von Pferdeserum gleich stark, um dann in die Hämolyse überzugehen.

Aus der Tab. 1 geht hervor, dass die spezifische Komplementablenkung nicht immer bei grösseren Antigenmengen auch entsprechend stärker ausfällt; vielmehr lässt sich ein Optimum an Antigen finden, das die stärkste Komplementbindung aufweist: hierbei schwächen grössere oder geringere Mengen desselben die Komplementfixierung. Hier tritt uns zuerst ein Unterschied entgegen zwischen der spezifischen Komplementablenkung und denjenigen Bindungsreaktionen, die für die Diagnose krankhafter Prozesse Bedeutung gewonnen haben. Sowohl bei der Wassermannschen Reaktion, als auch bei der v. Dungernschen Tumorreaktion fällt die

Komplementablenkung beim Gebrauch grösserer Extraktmengen als Antigen stärker, wenn auch unspezifischer aus, im Gegensatz zu der spezifischen Komplementablenkungsreaktion. Bei der letzteren findet sie stets ein Optimum an Antigen, das nicht mit dem Maximum desselben zusammenzufallen braucht.

Da sowohl die Natronlauge als auch die Salzsäure antikomplementär wirken und man das Komplement durch Einwirkung von OH- und H-Jonen vollständig inaktivieren kann, musste zuerst die alleinhemmende Dosis dieser Substanzen festgestellt werden. Zu diesem Zweck wurden zu 1 ccm Komplementaufschwemmung (1 ccm Komplement auf 20 ccm physiologischer Kochsalzlösung) absteigende Mengen von NaOH und HCl zugefügt. Nach 3—4 Stunden wurde in je einem Röhrchen 1 ccm 2fach sensibilisiertes Rinderblut in einer 5prozentigen Aufschwemmung zugesetzt, und das Resultat nach 3 Stunden abgelesen. Zu den Versuchen verwandte ich eine $^1/_{50}$ n. NaOH- und HCl-Lösung, die aus der $^1/_{10}$ n. Kahlbaumschen Originallösung durch entsprechende Verdünnung (1 : 4) mit physiologischer Kochsalzlösung dargestellt wurde.

Tabelle 2.

DH- oder H-Jonen	Absteigende Mengen von OH- oder H-Jonen wirken auf 1 ccm Komplementaufschwemmung; nach 3—4 St. wird das sensibilisierte Blut zugesetzt.								
	$\frac{6}{10}$	$\frac{4}{10}$	$\frac{3}{10}$	$\frac{2}{10}$	$\frac{1}{10}$	$\frac{1}{20}$	$\frac{1}{40}$	$\frac{1}{80}$	$\frac{1}{160}$
NaOH	++	++	+	−	−	−	−	−	−
HCl	−	−	−	++	−	−	−	−	−

Direkte Zerstörung der Erythrocyten durch HCl unter Bildung v. Hämatin.

Aus der Tabelle geht hervor, dass für die Komplementablenkungsversuche, bei denen gewöhnlich Anti-

körper, Antigen und Komplement aufeinander 3 Stunden wirken, nur die für sich nach dieser Zeit nicht hemmenden Mengen von NaOH und HCl genommen werden können und zwar als Maximum $^2/_{10}$ NaOH und $^1/_{10}$ HCl. Diese Grenze darf nicht überschritten werden.

Es war interessant, zu erfahren, wieweit diese Inaktivierung durch nachherige Neutrelisation rückgängig gemacht werden kann. Zu diesem Zweck, habe ich in verschiedenen Zeitintervallen durch entsprechende Mengen von Alkali oder Säure die weitere Wirkung ausgeschaltet und das Ambozeptorblut hinzugefügt. Es hat sich gezeigt, dass nach einer halben Stunde das Komplement schon völlig zerstört war, auch bei NaOH- und HCl-Mengen, die an der Grenze der Unwirksamkeit liegen.

Sowohl bei den obengenannten, als auch bei nachstehenden Versuchen wurden verschiedene Kontrollen angestellt, die die richtige Einstellung der Reaktion zeigen sollten:

1. Komplement + Ambozeptorblut-Hämolyse (das Komplement ist brauchbar).

2. Antigen + Komplement + Ambozeptorblut-Hämolyse (Antigen für sich hemmt nicht).

3. Antiserum + Komplement + Ambozeptorblut-Hämolyse (Antiserum besitzt keine Eigenhemmung.

4. Antigen + Ambozeptorblut-Hemmung (Antigen allein löst nicht).

5 Antiserum + Ambozeptorblut-Hemmung (Antiserum für sich löst nicht).

6) Antigen + Antiserum + Komplement + Ambozeptorblut-Hemmung (Antigen und Antiserum gemeinsam lenken das Komplement ab).

Ausserdem stellte ich, je nach dem Versuche, auch andere Kontrollen an, die an Ort und Stelle genannt werden.

Einfluss der OH- und H-Jonen auf die spezifische Komplementablenkung.

In jedes Röhrchen kommt 1 ccm Komplementaufschwemmung (1 : 20), $^1/_{40}$ Antiserum, $^1/_{80}$ Antigen und absteigende Mengen von NaOH und HCl. Das Volumen aller Röhrchen wird mit physiologischer Kochsalzlösung bis auf 2 ccm gebracht und die Röhrchen bleiben drei Stunden bei Zimmertemperatur stehen. Nach dieser Zeit wird 1 ccm doppeltsensibilisiertes Rinderblut in 5%iger Aufschwemmung hinzugefügt. Nach 3 Stunden, ebenfalls bei Zimmertemperatur, wird das Resultat abgelesen.

Zu den schon einmal genannten Kontrollen kommen hinzu:

1. Antigen + $^2/_{10}$ NaOH + Komplement: Hämolyse.
2. Antigen + $^1/_{10}$ HCl + Komplement: Hämolyse.
3. Antiserum + $^2/_{10}$ NaOH + Komplement: Hämolyse.
4. Antiserum + $^1/_{10}$ HCl + Komplement: Hämolyse.
5. Antigen + $^2/_{10}$ NaOH: Hemmung.
6. Antigen + $^1/_{10}$ HCl: Hemmung.
7. Antiserum + $^2/_{10}$ NaOH: Hemmung.
8. Antiserum + $^1/_{10}$ HCl: Hemmung.

Tabelle 3.

OH- oder H-Jonen	Absteigende Mengen von NaOH oder HCl wirken auf $^1/_{40}$ Antiserum + $^1/_{80}$ Antigen + Komplement							
	2/10	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640
OH-Jonen	−	−	±	+	$\frac{+}{+}$	$\frac{+}{+}$	$\frac{+}{+}$	$\frac{+}{+}$
H-Jonen		$\frac{+}{+}$	$\frac{+}{+}$	+	±	−	±	$\frac{+}{+}$

Wie aus der Tabelle hervorgeht, hebt sowohl die Natronlauge als auch die Salzsäure, in entsprechenden Mengen hinzugesetzt, die spezifische Komplementablenkung auf.

Da man sowohl die Antigenmenge, als auch die Menge des Antiserums in gewissen Grenzen modifizieren kann, ohne dass sich dabei äusserlich etwas an der Komplementbindung änderte, so habe ich untersucht, ob die Komplementablenkung unter Einwirkung von NaOH und HCl sich bei verschiedenen Antigen- und Antiserummengen auch verschieden verhält.

Tabelle 4.

OH-Jonen	Absteigende Antigenmengen. Ueberall 1/40 Antiserum.											
	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280	1/2560	1/5120	1/10240	1/20480
2/10	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
1/10	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
1/20	−	−	−	±	±	±	+	+	+	±	±	±
1/40	±	±	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1/80	±	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1/160	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1/320	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1/640	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Die Tabelle zeigt, dass bei grossen Antigenmengen auch geringe Alkalimengen imstande sind, die Ablenkung des Komplementes aufzuheben, resp. zu schwächen; auch bei ganz kleinen Antigenmengen lässt sich dasselbe beobachten.

Bei der Salzsäure lässt sich der Einfluss variabler Antigenmengen nur schwach erkennen.

Tabelle 5.

H-Jonen	Absteigende Antigenmengen. Überall 1/40 Antiserum.											
	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280	1/2560	1/5120	1/10240	1/20480
1/10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1/20	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1/40	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1/80	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−
1/160	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
1/320	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	−
1/640	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	−

Die Tabelle zeigt, dass bei geringen Antigenmengen die die Komplementablenkung aufhebende Wirkung sehr schwacher HCl-Konzentrationen deutlicher zum Vorschein kommt.

Einen viel deutlicheren Einfluss, als es beim Antigen der Fall ist, hat die Menge des Antiserums auf das Resultat der Einwirkung von Natronlauge und Salzsäure. (Tabelle 6.)

Weiter konnte das Antiserum nicht abgestuft werden, denn 1/80 Antigen gab mit 1/640 Antiserum nur noch schwache Komplementablenkung.

Es ist aus der Tabelle 6 ersichtlich, dass mit sinkender Antigenmenge auch die zur Aufhebung der Bindung nötige Konzentration von NaOH geringer wird, bei

Tabelle 6.

OH-Jonen	Absteigende Antiserummengen. Überall 1/80 Antigen.					
	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320
2/10	±	−	−	−	−	−
1/10	+	±	−	−	−	−
1/20	+	+	±	−	−	−
	+	+				
1/40	+	+	+	+	−	−
	+	+				
1/80	+	+	+	+	±	±
	+	+				
1/160	+	+	+	+	+	±
	+	+				
1/320	+	+	+	+	+	+
1	+	+	+	+	+	+
640	+	+	+	+	+	+

gleichbleibender Stärke der Komplementbindung in den Kontrollen.

Das Resultat der Wirkung von HCl bei gleicher Versuchsanordnung zeigt Tabelle 7.

Bei sinkender Menge des Antiserums tritt die, — die Komplementablenkung aufhebende, — Wirkung der Salzsäure deutlicher zu Tage.

Da sowohl die Natronlauge als auch HCl die spezifische Komplementablenkung aufheben, so fragt es sich, auf welche der drei Komponenten Antigen, Antiserum und Komplement die OH- und H-Jonen wirken. Die Beeinflussung des Komplementes ist fast ausgeschlossen, denn es wurden nur Konzentrationen von NaOH und HCl gebraucht, die das Komplement nicht zu ändern imstande sind.

Tabelle 7.

H-Jonen	Absteigende Antiserummengen. Überall 1/80 Antigen.					
	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320
1/10	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+
1/20	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+
1/40	+	±	±	−	−	−
	+	±	±			
1/80	+	±	±	−	−	−
	+	±	±			
1/160	+	+	+	+	−	−
	+	+				
1/320	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+		

Um zu entscheiden, ob das durch die OH- und H-Jonen modifizierte Antigen oder Antiserum an der Aufhebung der Komplementablenkung Schuld haben, wurde sowohl das eine als auch das andere der Wirkung von NaOH und HCl ausgesetzt und mit so modifiziertem Antigen und Präzipitinserum Komplementablenkungsversuche angestellt.

Wirkung aufs Antigen.

Zu 1/80 Antigen in 1 ccm physiologischer Kochsalzlösung, wurden absteigende Mengen von NaOH und HCl zugesetzt; nach drei Stunden wird mit dem so modifizierten Antigen der Komplementablenkungsversuch angestellt, der wiederum drei Stunden dauert. (Tabelle 8.)

Die die Komplementablenkung aufhebende Wirkung von OH- und H-Jonen ist weniger ausgeprägt, wenn die Natronlauge und Salzsäure aufs Antigen wirken,

Tabelle 8.

OH- oder H-Jonen	Absteigende Mengen von NaOH und HCl wirken auf 1/80 Antigen. Überall 1/40 Antiserum.					
	2/10	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160
Natronlauge . .	−	±	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +
Salzsäure . . .		+ / +	+ / +	±	±	+ / +

und dann mit dem so modifizierten Antigen der eigentliche Komplementsablenkungsversuch angestellt wird.

Wirkung aufs Antiserum.

Es wird 1/40 Antiserum in 1 ccm physiologischer NaCl-Lösung der Wirkung absteigender NaOH- und HCl-Mengen ausgesetzt und nach drei Stunden der eigentliche Bindungsversuch gemacht.

Tabelle 9.

OH- oder H-Jonen	Absteigende Mengen von NaOH und HCl wirken auf 1/40 Antiserum. Ueberall 1/80 Antigen.					
	2/10	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160
Natronlauge	−	±	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +
Salzsäure		+ / +	+ / +	±	±	+ / +

Auch in diesem Fall ist die Wirkung der NaOH und HCl nicht so ausgeprägt, wie bei der Beeinflussung des ganzen Bindungsversuches.

Wenn Natronlauge oder Salzsäure aufs Antigen + Antiserum wirken, so ist das Resultat analog dem bei getrennter Wirkung auf Antiserum oder Antigen.

Tabelle 10.

OH- oder H-Jonen	Absteigende Mengen von NaOH und HCl wirken auf 1/40 Antiserum + 1/80 Antigen; nach 3 St. Komplementablenkungsversuch.						
	2/10	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320
Natronlauge	–	–	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +
Salzsäure		+ +	+ +	+ –	+ –	+ –	+ +

Ausser den allgemeinen Kontrollen habe ich bei den letzten Versuchen noch folgende Kontrollen angewendet:

1. Antigen + 2/10 NaOH; nach drei Stunden Komplement, wiederum nach drei Stunden sensibil. Blut: Hämolyse.

In derselben Weise:

2. Antigen + 1/10 CCl: Hämolyse.
3. Antiserum + 2/10 NaOH: Hämolyse.
4. Antiserum + 1/10 HCl: Hämolyse.
5. Antigen + Antiserum + 2/10 NaOH: Hämolyse.
6. Antigen + Antiserum + 1/10 HCl: Hämolyse.

Da möglicherweise nicht die ganze NaOH und HCl an das Antigen resp. den Antikörper gebunden wurden, und daher ihre Wirkung nach Hinzufügung von Antiserum oder Antigen auch auf den ganzen Komplementablenkungsversuch fortdauert, habe ich eine Neutralisation vor der Anstellung des Bindungsversuches vorgenommen.

Wirkung aufs Antigen.

Nachdem die absteigenden Mengen von HCl und NaOH 3 Stunden aufs Antigen gewirkt hatten, wurde

eine Neutralisation vorgenommen und das Antiserum und Komplement hinzugesetzt. Gesamtvolumen 2 ccm.

Tabelle 11.

OH- oder H-Jonen	Absteigende Mengen von NaOH und HCl wirken auf $^1/_{80}$ Antigen; Neutralisation u. Hinzugabe v. $^1/_{40}$ Präzipitinserum + Komplement.					
	$\frac{2}{10}$	$\frac{1}{10}$	$\frac{1}{20}$	$\frac{1}{40}$	$\frac{1}{80}$	$\frac{1}{160}$
Natronlauge	—	++	++	++	++	++
Salzsäure		++	++	++	±	++

Die die Bindung aufhebende Wirkung der NaOH und HCl ist weniger ausgeprägt als in den Fällen, wo keine Neutralisation vorgenommen wurde.

Wirkung aufs Antiserum.

$^1/_{40}$ Antiserum wird mit absteigenden Mengen von NaOH und HCl zusammengebracht; nach 3 Stunden Neutralisation und Anstellung des eigentlichen Bindungsversuches.

Tabelle 12.

OH- oder H-Jonen	Absteigende Mengen von NaOH und HCl wirken 3 St. auf $^1/_{40}$ Antiserum; Neutralisation und Vornahme des Bindungsversuches ($^1/_{80}$ Antiserum + Komplement					
	$\frac{2}{10}$	$\frac{1}{10}$	$\frac{1}{20}$	$\frac{1}{40}$	$\frac{1}{80}$	$\frac{1}{160}$
Natronlauge . .	—	++	++	++	++	++
Salzsäure . . .		++	++	++	±	++

Auch hier ist die Wirkung der Natronlauge und Salzsäure schwächer als in den Fällen, wo die Neutralisation nicht vorgenommen wurde.

Wenn die OH- und H-Jonen auf das Antigen + Antiserum wirken und dann die Neutralisation gemacht wird, so lässt sich nur eine aufhebende Wirkung der $^2/_{10}$ NaQH bemerken; es wurde deshalb die Tabelle nicht angeführt.

Bei geringen Antigen- und Antiserummengen kommen die Unterschiede zwischen der Beeinflussung durch NaOH und HCl des ganzen Bindungsversuches und der einzelnen Komponenten (Antigen oder Antiserum) desselben am besten zum Vorschein.

Wie die Tabelle 13 zeigt, sind die zur Aufhebung der Komplementbindung nötigen Mengen von Alkali und Säure dann am geringsten, wenn die OH- und H-Jonen auf den vollen Bindungsversuch wirken; etwas grösserer Quantitäten von Alkali und Säure bedarf es zur Aufhebung der Komplementablenkung bei der Einwirkung auf das Antigen + Antiserum; noch grössere Mengen sind dagegen nötig, wenn nur das Antigen resp. Antiserum der Wirkung von OH- und H-Jonen ausgesetzt sind.

Folgende Kontrollen wurden noch speziell bei diesen Versuchen angestellt:

1. Antigen + $^2/_{10}$ NaOH; nach 3 Stunden Neutralisation + Komplement; wiederum nach 3 Stunden sensibil. Blut-Hämolyse.

In ähnlicher Weise

2. Antigen + $^1/_{10}$ HCl; Neutralisation, Komplement: Hämolyse.

3. Antiserum + $^2/_{10}$ NaOH; Neutralisation, Komplement: Hämolyse.

4. Antiserum + $^1/_{10}$ HCl; Neutralisation, Komplement: Hämolyse.

5. Antigen + Antiserum + $^2/_{10}$ NaOH: Neutralisation, Komplement: Hämolyse.

Tabelle 13.

OH- oder H-Jonen	Absteigende Mengen von NaOH und HCl wirken auf:																																																
	$^1/_{1280}$ Antigen														$^1/_{320}$ Antiserum														$^1/_{1280}$ Antigen + $^1/_{320}$ Antiserum														d. Komplement-ablenkungsversuch						
	ohne Neutral.							mit Neutral.							ohne Neutral.							mit Neutral.							ohne Neutral.							mit Neutral.													
	$\frac{2}{10}$	$\frac{1}{10}$	$\frac{1}{20}$	$\frac{1}{40}$	$\frac{1}{80}$	$\frac{1}{160}$	$\frac{1}{320}$	$\frac{2}{10}$	$\frac{1}{10}$	$\frac{1}{20}$	$\frac{1}{40}$	$\frac{1}{80}$	$\frac{1}{160}$	$\frac{1}{320}$	$\frac{2}{10}$	$\frac{1}{10}$	$\frac{1}{20}$	$\frac{1}{40}$	$\frac{1}{80}$	$\frac{1}{160}$	$\frac{1}{320}$	$\frac{2}{10}$	$\frac{1}{10}$	$\frac{1}{20}$	$\frac{1}{40}$	$\frac{1}{80}$	$\frac{1}{160}$	$\frac{1}{320}$	$\frac{2}{10}$	$\frac{1}{10}$	$\frac{1}{20}$	$\frac{1}{40}$	$\frac{1}{80}$	$\frac{1}{160}$	$\frac{1}{320}$	$\frac{2}{10}$	$\frac{1}{10}$	$\frac{1}{20}$	$\frac{1}{40}$	$\frac{1}{80}$	$\frac{1}{160}$	$\frac{1}{320}$	$\frac{2}{10}$	$\frac{1}{10}$	$\frac{1}{20}$	$\frac{1}{40}$	$\frac{80}{80}$	$\frac{1}{160}$	$\frac{1}{320}$
NaOH	−	−	+ −	+ −	+	+ +	+ +	−	+ −	+	+	+ +	+ +	+ +	−	−	−	+	+ +	+ +	+ +	−	−	+ −	+ +	+ +	+ +	+ +	−	−	−	+ −	+ +	+ +	+ +	−	−	−	+ +	+ +	+ +	+ +	−	−	−	+ −	+ −	+	+
HCl		+ +	+ +	+ −	−	+	+ +		+ +	+	−	+	+ +	+ +		+ +	+	−	−	+ −	+ +		+ +	+	+ −	−	+ −	+ +		+ +	+ +	+	+ −	−	+ +		+ +	+ +	+ −	−	+ −	+ +		+ +	+	+ −	−	−	+

6. Antigen + Antiserum + $^1/_{10}$ HCl; Neutralisation, Komplement: Hämolyse.

Aus dem bis jezt Gesagten geht hervor, dass die spezifische Bindung sowohl durch Natronlauge als auch durch die Salzsäure aufgehoben wird, und zwar am leichtesten, wenn die OH- und H-Jonen auf den ganzen Ablenkungsversuch wirken.

Die Mengen des für die Bindung angewandten Antigens und Antiserums haben einen Einfluss auf die zur Aufhebung der Bindung erforderliche Konzentration der Natronlauge und Salzsäure.

Da die Komplementablenkung bei den spezifischen Bindungsreaktionen verschieden stark ausfällt, je nachdem das Antiserum oder Antigen stärker oder schwächer erhitzt wurde, so schien es von Interesse zu sein, festzustellen, wie sich dabei die die Komplementablenkung aufhebende Wirkung der NaOH und HCl gestaltet.

Die Untersuchungen von Moreschi[22]) haben gezeigt, dass die Präzipitinsera, nachdem sie auf 70° erhitzt wurden, keine Komplementablenkung mit dem Antigen mehr geben. Es lässt sich dagegen keine Schwächung der Bindungsreaktion bemerken, solange die Temperatur des Antiserums nicht 67° erreicht hat. Das Antigen wird vollständig unbrauchbar erst bei 100°, gibt aber von 75° an eine immer schwächer werdende Komplementablenkung. Wenn man mit einem verschieden hoch (56—65°) erhitzten Antigen oder Antiserum Komplementablenkungsversuche anstellt und dann die OH- und H-Jonen wirken lässt, so liefern sie von den der auf 56° erhitzten Sera nur unwesentlich abweichende Resultate. Es lässt sich kein regelmässiger Einfluss der Temperatur auf die zur Aufhebung der Bindung nötige Menge von NaOH und HCl feststellen, solange man innerhalb der Temperaturgrenzen bleibt, die keine sichtbare Schwächung der Bindung in den Kontrollen ohne NaOH und HCl bewirken. Ich lasse deshalb die Tabelle nicht folgen.

Auch habe ich, angeregt durch das von v. Dungern[23]) mitgeteilte interessante Verhalten mit NaOH zusammen erhitzter luetischer und Tumorsera, festzustellen gesucht, wie sich die Wirkung von OH- und H-Jonen auf die Bindungsversuche gestaltet, wenn das Antiserum resp. Antigen mit Natronlauge oder Salzsäure zusammen verschieden hoch erhitzt wird.

Zu diesem Zweck wird das Antiserum oder Antigen mit absteigenden NaOH- und HCl-Mengen verschieden hoch 20 Minuten lang erhitzt und sodann der eigentliche Bindungsversuch angestellt.

Der Einfluss auf das Antiserum ist deutlicher und und konstanter als der auf das Antigen; deshalb soll nur das Resultat der Einwirkung auf den Antikörper in Form einer Tabelle angegeben werden.

Tabelle 14.

Temperaturen, auf die das Serum erhitzt wird	Überall $^1/_{80}$ Antigen. Absteigende Mengen von Antiserum werden erhitzt mit:								
	$^2/_{10}$ NaOH			$^1/_{10}$ NaOH			$^1/_{20}$ NaOH		
	1/10	1/20	1/40	1/10	1/20	1/40	1/10	1/20	1/40
54°	±	—	—	+	±	—	±	+	±
56°	±	—	—	+	±	—	±	±	±
60°	—	—	—	—	—	—	±	—	—
65°	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Wie aus der Tabelle hervorgeht, sinkt mit steigender Temperatur die für Aufhebung der Ablenkung nötige Menge von NaOH, wobei die Versuche in Temperaturgrenzen gehalten wurden, die für sich die Stärke der Komplementablenkung nicht beeinflussen.

Bei der Salzsäure tritt dies nicht deutlich zu Tage.

Die nötigen Kontrollen zeigen, dass das Antigen oder Antiserum, mit NaOH und HCl erhitzt, keine Ablenkung für sich gaben.

Einfluss der OH- und H-Jonen auf die v. Dungernsche Tumorreaktion und die Komplementablenkung luetischer Sera mit dem nach Dungern dargestellten Blutextrakt.

Zur Untersuchung des Einflusses der Natronlauge und Salzsäure auf andere Komplementbindungsreaktionen wurde die Eigenschaft der Tumor- und Luessera benutzt, dass sie mit dem nach v. Dungern[24]) dargestellten Blutextrakt Komplementablenkung geben.

Das Serum wird nach v. Dungern unerwärmt $^1/_{20}$ genommen. Das Extrakt, dessen Brauchbarkeit Vorversuche gezeigt haben, wird folgendermassen dargestellt. Defibrinierte und durch physiologische Kochsalzlösung vom Serum befreite rote Blutkörperchen (am häufigsten von Paralytikern) werden mit der 20fachen Menge Aceton 3 Tage extrahiert; das Filtrat wird bei 37° eingedampft und der Rückstand in $^1/_{10}$ der Eigenmenge absoluten Alkohols gelöst. Diese Stammlösung wird täglich frisch mit physiologischer NaCl-Lösung im Verhältnis 1 : 5 verdünnt. Das so dargestellte Extrakt fungiert als Antigen in Mengen von 1, $^8/_{10}$, $^6/_{10}$ und $^4/_{10}$. Die untersuchten Sera waren alle 1—2 Tage alt und besassen in der Menge von $^1/_{10}$ keine Eigenhemmung.

Im aktiven ($^1/_{20}$) Zustand angewandt, geben sowohl die Tumorsera als auch die der Syphilitiker Komplementablenkung. Durch Zusatz von $^2/_{10}$ NaOH wird die Komplementbindung luetischer Sera aufgehoben, die der Tumorkranken bleibt aber bestehen. Anders ist es aber, wenn man die Sera inaktiviert und dann mit der doppelten Menge ($^1/_{10}$) den Komplementablenkungsversuch anstellt.

Tabelle 15.

Art des Serums	Zu der v. Dungernschen Reaktion ($^8/_{10}$ Blutextrakt) werden absteigende Alkalimengen zugesetzt																			
	Serum aktiv ($^1/_{20}$)										Serum bei 56° inakt. ($^1/_{10}$)									
	2/10	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280	1/2560	2/10	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280	1/256
Carcinomserum	+ / +	−	−	−	−	−	−	+ / +	+ / +	+ / +	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Luesserum	−	−	−	−	−	−	+ / −	+	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +	+	+	+	+	+	+	+	+

Wie die Tabelle zeigt, wird die Komplementablenkung der Carcinomsera durch $^2/_{10}$ NaOH nicht aufgehoben; die Luessera zeigen im Gegensatz dazu bei gleicher Versuchsanordnung keine Komplementbindung; geringere Alkalimengen ($^1/_{10} - ^1/_{320}$) heben die Komplementablenkung sowohl der Carcinom- als auch der Luessera auf. Man kann dabei denken, wie es auch Sachs[25]) getan hat, dass die Luessera beim Erhitzen alkalischer werden und deshalb eine schwächere Komplementablenkung aufweisen; das Verhalten der Carcinomsera kann dadurch aber nicht erklärt werden, weil ja die Zunahme ihrer Alkaleszens ihre komplementbindende Eigenschaft nur steigern müsste.

Um das inaktivierte und damit unbrauchbare Serum wieder brauchbar zu machen, habe ich versucht, den die Bindung begünstigenden Faktor, nämlich die Natronlauge, stärker wirken zu lassen. Es ist möglich, dieses durchzuführen, entweder durch Gebrauch grösserer Alkalimengen oder, indem man das Serum direkt mit der Natronlauge zusammenbringt.

Da sich die allein hemmende Dosis von Natronlauge zwischen $^3/_{10} - ^4/_{10}$ befindet, so konnten grössere Alkalimengen eine Hemmung vortäuschen, und ich

habe deshalb das inaktivierte Carcinomserum direkt der Wirkung der Lauge ausgesetzt.

Zu diesem Zweck wurden absteigende Mengen von NaOH zu je $^1/_{10}$ inakt. Carcinomserums zugefügt und mit dem so modifizierten Serum die Tumorreaktion angestellt.

Tabelle 16.

Extraktmengen	Absteigende Mengen von NaOH wirken 1 St. auf $^1/_{10}$ inakt. Carcinomserum.			
	$\frac{2}{10}$	$\frac{1}{10}$	$\frac{1}{20}$	$\frac{1}{40}$
1	+ +	+	−	−
$\frac{8}{10}$	+	±	−	−
$\frac{6}{10}$	+	−	−	−
$\frac{4}{10}$	−	−	−	−

Die Tabelle zeigt, dass die Stärke der Komplementbindung abhängig ist von der Menge des Extraktes und der Konzentration der auf das Serum wirkenden Lauge. Bei grösseren Extraktmengen und stärkeren Laugenkonzentrationen ist auch die Bindung des Komplementes stärker.

Wenn man das Resultat der Laugenwirkung zeitlich betrachtet, so ergibt sich, dass die Stärke der Komplementablenkung von der Zeit, in der die Natronlauge aufs Serum gewirkt hat, abhängig ist.

Tabelle 17.

Dauer der Einwirkung	Absteigende Mengen von NaOH wirken auf 1/10 inakt. Carcinomserum. Extraktmenge 1 ccm			
	2/10	1/10	1/20	1/40
1/2 St.	—	—	—	—
1 „	+ +	+ —	—	—
1 1/2 „	+ +	+	—	—
2 „	+ +	+ +	+ +	+ —

Aus der Tabelle ist zu ersehen, dass erst nach einer Stunde die Wirkung der Natronlauge zu Tage tritt; starke Komplementbildung gibt das Serum aber erst, nachdem es 1 1/2—2 Stunden durch die Lauge beeinflusst wurde. Stets wurde auch zur Kontrolle eine Tumorreaktion mit aktivem Serum angestellt, die in allen Fällen typisch ausfiel. Auch habe ich mich durch Kontrollversuche überzeugt, dass das Carcinomserum, nachdem es unter dem Einfluss von NaOH gestanden ist, keine Eigenhemmung besass.

Um zu unterscheiden, inwieweit die Natronlauge, nachdem sie das Carcinomserum reaktiviert hat, für den eigentlichen Ablenkungsversuch überflüssig ist, habe ich eine Neutralisation vorgenommen und erst dann die Tumorreaktion angestellt.

Die Tabelle 18 zeigt, dass bei vorheriger Neutralisation die Hemmungen bedeutend stärker ausfallen als ohne dieselbe.

Die Natronlauge besitzt also die Eigenschaft, ein durch Erhitzen auf 56° für die v. Dungernsche Reaktion unwirksam gemachtes Carcinomserum wieder zu reaktivieren. Dadurch, dass ich die NaOH auf das

Tabelle 18.

Extraktmengen.	Absteigende Mengen von NaOH wirken 1 Stunde auf $^1/_{10}$ inakt. Carcinomserum. Neutralisation vor der Anstellung der Tumorreaktion.			
	$\frac{2}{10}$	$\frac{1}{10}$	$\frac{1}{20}$	$\frac{1}{40}$
1	+ +	+ +	±	−
$\frac{8}{10}$	+ +	±	±	−
$\frac{6}{10}$	+	±	−	−
$\frac{4}{10}$	±	−	−	−

Serum allein (erhitzt $^1/_{10}$) eine Stunde wirken liess und dann 1. ohne, 2. nach vorheriger Neutralisation mit dem so modifizierten Serum den eigentlichen Komplementablenkungsversuch anstellte, wurde durch den positiven Ausfall desselben direkt bewiesen, dass es sich um eine Wirkung der Natronlauge auf das Serum handelt. Dieses verschiedene Verhalten des nach der Wirkung der Natronlauge nicht neutralisierten und der Neutralisierung ausgesetzten Serums führte mich zur folgenden Annahme: In der Wirkung der Natronlauge auf die Ablenkungsreaktion müssen wir zwei Phasen unterscheiden; in der ersten wirkt die Lauge auf das Serum reaktivierend, in der zweiten aber der Komplementablenkung vollkommen entgegengesetzt. Durch die Ausschaltung (mittels Neutralisation) der zweiten Phase können wir eine Komplementablenkung zustande bringen resp. verstärken. Von dem gegenseitigen Grössenverhältnis der beiden Komponenten hängt es ab, ob ein erhitztes Serum eine Komplementablenkung geben wird oder nicht. Daher geben die Sera, welche nach der reaktivierenden Wirkung der NaOH neutralisiert wur-

den, eine stärkere Bindung und zeigen diese bei denselben Extraktmengen, mit welchen die nicht neutralisierten Sera Hämolyse gaben.

Ich habe auch versucht, das bei 56° inaktivierte und für die Tumorreaktion unwirksam gewordene Carcinomserum durch HCl zu regenerieren. Dies gelingt nicht so regelmässig wie mit der Natronlauge, auch fällt die Komplementablenkung nicht so stark aus.

Tabelle 19.

Extraktmengen	Absteigende Mengen von HCl wirken 1 St. auf $^1/_{10}$ inakt. Carcinomserum.			
	$\frac{1}{10}$	$\frac{1}{20}$	$\frac{1}{40}$	$\frac{1}{80}$
1	+	+	±	−
$\frac{8}{10}$	+	±	−	−
$\frac{6}{10}$	+	−	−	−
$\frac{4}{10}$	−	−	−	−

Aus der Tabelle geht hervor, dass man mit $^1/_{10}$ bis $^1/_{40}$ HCl die Carcinomsera, nachdem sie auf 56° erhitzt wurden, wieder für die Tumorreaktion brauchbar machen kann.

Ein Einfluss der Neutralisation vor der Anstellung des Versuches, wie es bei NaOH der Fall war, wurde nicht beobachtet. Wenn die Sera höher als auf 56° erhitzt werden, so gelingt es nicht mehr, sie mit NaOH oder HCl zu regenerieren.

Dass serologisch unwirksame Verbindungen durch H-Jonen wieder brauchbar gemacht werden, ist schon länger bekannt. So wird das beim Zusammenbringen von Toxin und Antitoxin entstehende unwirksame Ge-

misch durch Salzsäure in seine wirksamen Komponenten gespalten (Morgenroth[26]). Auch verträgt, in salzsaurer Lösung erhitzt, das Toxin Temperaturen von 100°, dagegen wird es unwirksam, wenn es ohne HCl so hoch erhitzt wird. (Sachs und Kyes).

Die Salzsäure übt also einen gewissen Schutz aus; ihre Wirkung ist in diesem Fall ähnlich derjenigen der Natronlauge, die, mit Carcinomserum zusammengebracht, es gestattet, dieses auf 54° zu erhitzen, ohne für die Tumorreaktion unbrauchbar zu werden. Bei gleicher Versuchsanordnung verliert das Luesserum die Eigenschaft, mit Blutextrakt positiv zu reagieren, obgleich es bei einfacher Erhitzung noch bei 60° reaktionsfähig bleibt. Dieses verschiedene Verhalten erhitzter luetischer Sera hat mich veranlasst, noch genauer zu prüfen, wie sich der Einfluss von OH- und H-Jonen dabei gestaltet. Zu diesem Zweck wurde sowohl aktives als auch bei 56 und 60° erhitztes Serum für die Komplementbildung benutzt, wobei als Antigen der Blutextrakt diente. Die Natronlauge und Salzsäure habe ich in absteigenden Dosen zugesetzt.

Tabelle 20.

Temperaturen, auf die das Serum erhitzt wurde	Absteigende Mengen von NaOH wirken auf 1 ccm Komplementaufschwemmung + 8/10 Blutextrakt + Luesserum (akt. 1/20, erhitzt 1/10).								
	2/10	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280
aktiv	−	−	−	−	−	−	+	+	+
56°	+	+	+	+	+	+	+	+	+
60°	−	−	+	+	+	+	+	+	+

Wie aus der Tabelle ersichtlich ist, kann die Komplementbindung aktiver Sera mit sehr geringen Mengen von Alkali (1/320) aufgehoben werden; bei auf 56 und 60° erhitzten Seris sind dazu viel grössere

Alkalimengen nötig. Aus der Menge des für die Aufhebung der Komplementablenkung nötigen Alkali kann man somit keinen Schluss auf die Stärke der Bindungsreaktion ziehen, denn mit dem Erwärmen luetischer Sera wird ihre Brauchbarkeit für die Komplementablenkung geringer, und doch sind grössere Alkalikonzentrationen nötig, um die Komplementbindung zu beseitigen.

Der Einfluss der Salzsäure gestaltet sich ganz anders.

Tabelle 21.

Temperaturen, auf die das Serum erhitzt wurde	Absteigende Mengen von HCl wirken auf 1 ccm Komplementaufschwemmung + 8/10 Blutextrakt + Luesserum (aktiv 1/20, erhitzt 1/10)					
	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320
aktiv	+ +	+ +	+	+	+	+
56°	+ +	+ +	+	+	+	+
60°	+	+	+	+	+	+

Die Komplementbindung wird, wie die Tabelle zeigt, durch H-Jonen begünstigt.

Um zu sehen, ob die OH-Jonen, die die Komplementablenkung luetischer Sera beseitigen, ihren Angriffspunkt am Serum oder am Extrakt haben, habe ich absteigende Mengen von Natronlauge dem Extrakt zugesetzt und mit dem so modifizierten Extrakt nach vorheriger Neutralisation den Bindungsversuch angestellt.

Tabelle 22.

Extraktmenge.	Absteigende Mengen von NaOH wirken auf absteigende Mengen des Extraktes. Nach 3 St. Neutralisation und Anstellung der Komplementablenkung.							
	2/10	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640
1	+	+	+	+	+	+	+ +	+ +
8/10	+	+	+	+	+	+	+	+
6/10	±	+	+	+	+	+	+	+
4/10	−	−	−	−	−	−	−	−

Es zeigt sich, dass bei dieser Versuchsanordnung die Wirkung der Natronlauge nicht oder kaum zu Tage tritt. Die Röhrchen mit $^4/_{10}$ Extrakt wiesen auch ohne Natronlauge Hämolyse auf; es handelt sich hier also in der untersten Reihe nicht um die Wirkung der OH-Jonen auf den Extrakt. Man muss daher annehmen, dass die luetischen Sera selbst durch die Natronlauge so verändert werden, dass sie die Komplementablenkung nicht mehr geben können. Diese Annahme kann auch bewiesen werden.

Absteigende Alkalimengen werden mit luetischem Serum (aktiv $^1/_{20}$) zusammengebracht und 3 St. stehen gelassen. Nach der Neutralisation wird der Bindungsversuch vorgenommen.

Wie aus der Tabelle 23 ersichtlich, ist das der NaOH-Wirkung ausgesetzte Luesserum für die Komplementbindung unwirksam; ihre volle Wirkungskraft entfaltet aber die Natronlauge erst dann, wenn sie auf den ganzen Bindungsversuch einwirkt (s. Tabelle 20).

Tabelle 23.

Extraktmengen	Absteigende Mengen von NaOH wirken 3 St. lang auf $^1/_{20}$ akt. Luesserum. Neutralisation und Bindungsversuch.						
	$\frac{2}{10}$	$\frac{1}{10}$	$\frac{1}{20}$	$\frac{1}{40}$	$\frac{1}{80}$	$\frac{1}{160}$	$\frac{1}{320}$
1	—	—	+	+	+	+	+
$\frac{8}{10}$	—	—	—	+	+	+	+
$\frac{6}{10}$	—	—	—	—	—	+	+

Wie v. Dungern[27]) gezeigt hat, vermag das Alkali abgesehen von der Wirkung aufs aktive Serum auch mit dem Luesserum zusammen erhitzt, daselbe unwirksam zu machen. v. Dungern erhitzt dabei die Sera auf 54°, wobei auf $^1/_{10}$ Serum $^2/_{10}$—$^1/_{50}$ n. NaOH zugefügt wird. Ich habe dabei festgestellt, welchen Einfluss die OH-Jonenkonzentration und die Temperatur, auf die das Serum + NaOH erhitzt wurden, besitzen.

Absteigende Alkalimengen werden mit gleichen Serummengen verschieden hoch erhitzt, und es wird mit dem so modifizierten Serum der Bindungsversuch angestellt. Die Volumina ($^2/_{10}$) der zugesetzten NaOH bleiben trotz fallender Konzentrationen gleich.

Tabelle 24.

Temperaturen	Syphilitisches Serum (aktiv $^1/_{20}$, erhitzt $^1/_{10}$) wird mit absteigenden Mengen von NaOH erhitzt. Blutextrakt $^8/_{10}$.				
	$\frac{2}{10}$	$\frac{1}{10}$	$\frac{1}{20}$	$\frac{1}{40}$	$\frac{1}{80}$
aktiv	—	—	—	+	+
54°	—	±	+	+	+
56°	—	—	±	±	+
60°	—	—	—	±	+

Wie wir sehen, sind bei 54° viel grössere Alkalimengen nötig, um das Luesserum unwirksam zu machen, als bei 56 und 60°.

Wenn wir diese Tabelle mit der Tabelle Nr. 20 vergleichen, so sehen wir, dass die OH-Jonen viel wirksamer in der Aufhebung sind, wenn sie mit dem Serum zusammen erhitzt, als wenn sie nachträglich hinzugefügt werden.

Um nun weiter zu untersuchen, ob die die Komplementablenkung aufhebende Wirkung der Natronlauge sich auch auf die beim Stehen auftretende Eigenhemmung der Sera erstreckt, habe ich absteigende für sich hemmmende Dosen eines luetischen Serums mit abfallenden Mengen von NaOH versetzt und sie dann auf ihre Eigenhemmung geprüft.

Tabelle 25.

Serummengen	Absteigende Mengen von NaOH wirken 3 St. auf abfallende Mengen von Luesserum; nach dieser Zeit Prüfung auf Eigenhemmung			
	$\frac{2}{10}$	$\frac{1}{10}$	$\frac{1}{20}$	$\frac{1}{40}$
$\frac{3}{10}$	+	+	+	+
		+	+	+
$\frac{2}{10}$	+	+	+	+
		+	+	+
$\frac{1}{10}$	−	+	+	+
			+	+
$\frac{1}{20}$	−	−	+	+

Die Tabelle zeigt, dass man durch $^2/_{10}$ Natronlauge die Eigenhemmung von $^1/_{10}$ luetischen Serum beseitigen kann. Mit einem so modifizierten Serum habe ich die Wassermannsche Reaktion anzustellen versucht.

Tabelle 26.

Extraktmengen	Abfallende, nicht mehr für sich durch die Einwirkung von NaOH hemmende Serummengen werden abfallenden Quantitäten von Meerschweinchenherzextrakt zugesetzt	
	$\frac{1}{10}$	$\frac{1}{20}$
$\frac{4}{10}$	+	—
$\frac{2}{10}$	+	—

Die Komplementbindung ist, wie die Tabelle zeigt, bei so modifizierten Seren, nur sehr schwach positiv.

Zusammenfassung.

1. Sowohl die OH- als auch die H-Jonen heben die spezifische Komplementablenkung auf; diese Wirkung lässt sich am besten zustande bringen, wenn die NaOH- und HCl auf den ganzen Komplementbindungsversuch wirken (Tab. 13).

2. Die Komponenten des Ablenkungsversuches, Antigen und Antikörper, werden durch NaOH und HCl so modifiziert, dass sie für die Bindung des Komplementes unwirksam werden (Tabelle 13).

3. Beim Erhitzen der Antisera mit NaOH wird die zur Aufhebung der Bindung nötige Alkalimenge geringer (Tabelle 14).

4. Bei fallenden Mengen von Antigen und Antiserum vermögen auch geringere Konzentrationen von Alkali und Säure die Komplementablenkung aufzuheben (Tabelle 5 und 6).

5. Es ist möglich, das auf 56° erhitzte und für die Tumorreaktion nicht mehr brauchbare Carcinomserum durch OH- und H-Jonen zu reaktivieren. Zugleich stellte sich heraus, dass die Komplementbindung stärker ausfällt, wenn man nach Reaktivierung des Serums eine Neutralisation vornimmt und erst dann den Bindungsversuch anstellt (Tabelle 17 und 18).

6. Die für die Aufhebung der Komplementablenkung luetischer Sera nötige Alkalimenge ist von der Temperatur, auf die das Serum erhitzt wurde, abhängig (Tabelle 20).

7. Es handelt sich bei der v. Dungernsche Reaktion aufhebenden Wirkung der OH-Jonen um eine direkte Beeinflussung des luetischen Serums (Tabelle 23).

8. Die beim Stehen auftretende Eigenhemmung luetischer Sera kann durch OH-Jonen beseitigt werden; die so modifizierten Sera geben schwache W. R. (Tabelle 25 und 26).

9. Die OH- und H-Jonen beeinflussen verschiedene Bindungsreaktionen verschieden; bei manchen heben sie die Komplementablenkung auf, bei andern begünstigen sie die Fixierung des Komplementes. Es ist vielleicht diese Erscheinung in Zusammenhang zu bringen mit der Natur, bezw. Reaktion der die Komplementbindung vermittelnden Reaktionskörper. Diese sind möglicherweise bei den spezifischen Antiseren neutrale, bei den Carcinomseren alkalische, und bei Luesseren saure Verbindungen. Über die nähere Natur dieser „Reagine" lässt sich aus dem Mitgeteilten vorläufig noch nichts Sicheres sagen.

Zum Schluss möchte ich meinem hochverehrten Lehrer Herrn Professor v. Dungern für die Anregung zu dieser Arbeit und das ihr entgegengebrachte Interesse meinen innigsten Dank aussprechen.

Literatur.

1) Münch. med. Wochenschrift, 1899.
2) Annales de l'Institut Pasteur, 1901, Bd. XV.
3) Ebenda, 1902, Bd. XVI.
4) Berl. kl. Wochenschrift, 1905, N. 37.
5) Ebenda, 1906, N. 4.
6) Berl. kl. Wochenschrift, 1905, N. 44.
7) Deutsche med. Wochenschrift, 1906, N. 15.
8) Ibidem.
9) Med. Klinik, 1905, Bd. I, N. 55.
10) Handb. der Technik u. Methodik d. Immunitätsforschung, Bd. II.
11) Ibidem.
12) Deutsche med. Wochenschrift, 1906, N. 19.
13) VI. Tagung der freien Vereinigung für Mikrobiologie, 1912. Ref.: Münch. med. Woch., 1912, N. 33.
14) Münch. med. Wochenschrift, 1912, N. 20.
15) Berl. kl. Wochenschrift, 1907, N. 13.
16) Ebenda, 1907, N. 34.
17) Brit. med. Journ., 1910, Vol. II.
Ref: Zeitschr. f. Immunitätsforschung und exper. Ther., 1910, Bd. II.
18) Berl. kl. Wochenschrift, 1908, N. 14.
19) Ibidem.
20) Zeitschr. f. Immunitätsforschung, Bd. VIII.
21) Münch. med. Wochenschrift, 1912, N. 20.
22) Centralbl. f. Bakteriologie, 1907, Bd. 46.
23) Münch. med. Wochenschrift, 1912, N. 52.
24) Ebenda, N. 20 u. 52.
25) Berl. kl. Wochenschrift, 1908, N. 14.
26) Berl. kl. Wochenschrift, 1905, N. 50.
27) Münch. med. Wochenschrift, 1912, N. 20 u. 52.

Lebenslauf.

Geboren wurde ich, Srul-Meier Lindenschatt, als Sohn des Kaufmanns Samuel und seiner Gattin Rachel Lindenschatt, mosaischer Konfession, am 25. Oktober 1888 zu Warschau in Russland. Den ersten Unterricht erhielt ich zu Hause, besuchte dann die 7-klassige Staatsrealschule in Warschau, die ich im Jahre 1907 absolviert habe; später bestand ich die Ergänzungsprüfung in Latein im vollen Umfange eines humanistischen Gymnasiums. Mit dem Wintersemester 1907/08 begann ich das Studium der Chemie an dem Friedrichs-Polytechnikum in Cöthen. Im Mai 1908 bin ich an der Kgl. Albertus-Universität zu Königsberg immatrikuliert worden, wo ich im Sommersemester 1908 Chemie studiert habe. Vom Wintersemester 1908/09 bis zum Schluss des Sommersemesters 1911 war ich ordentlicher Hörer der medizinischen Fakultät an der Universität Königsberg. Im Oktober 1911 bin ich an der Ruprecht Karls-Universität zu Heidelberg immatrikuliert worden.